



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 88106477.7

[51] Int.Cl⁴

C12M 3/00

[43] 公开日 1989年3月29日

[22] 申请日 88.9.7

[30] 优先权

[32] 87.9.7 [33] GB [31] 8721018

[71] 申请人 艾尔坎国际有限公司

地址 加拿大魁北克省

[72] 发明人 斯蒂芬·约翰·邱吉豪斯

伊丽莎白·米里亚姆·斯卡门斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 姜建成 杨丽琴

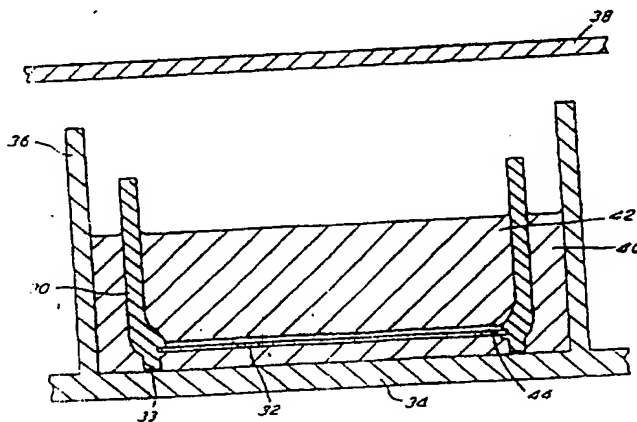
C12N 5/00

说明书页数: 19 附图页数: 2

[54] 发明名称 多孔无机膜载体及其使用方法

[57] 摘要

一种培养或保持哺乳动物细胞的方法, 包括将细胞培养物涂到多孔无机膜载体的表面上。该载体最好是透明的阳极氧化铝膜。支持细胞(44)生长或使细胞保持于其上的载体可包括一个短管(30)和一个多孔无机膜圆片(32), 圆片的周边密封在短管的一端。



1. 一种利用多孔无机载体培养或保持细胞的方法, 其特征在于, 将细胞培养物涂到多孔无机膜载体表面上, 在一定条件下保持细胞使其生长或保留在载体上。

2. 一种如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 其中的膜载体为氧化铝。

3. 一种如权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 其中的氧化铝膜为阳极氧化铝膜。

4. 一种如权利要求 1-3 中任一项所述的方法, 其特征在于, 其中的膜载体是透明的。

5. 一种如权利要求 1-4 中任一项所述的方法, 其特征在于, 其中的细胞为哺乳动物细胞。

6. 一种支持细胞生长或使细胞保持于其上的多孔无机膜载体。

7. 一种如权利要求 6 所述的载体, 其特征在于, 它是用权利要求 1-5 中任一项的方法制成的。

8. 一种如权利要求 6 或 7 所述的载体, 其特征在于, 它包括一个短管(30) 和一个多孔膜圆片(32), 该膜圆片的周边密封在短管的一端, 活细胞保持在短管内的膜上。

9. 培养细胞的装置, 其特征在于, 它包括一个多孔无机膜载体(32), 该载体的第一表面与第一液体培养基(40) 相接触, 而粘附生长的细胞(44) 的第二表面与第二液体培养基(42) 相接触, 其中第一液体培养基只通过多孔载体与第二液体培养基相通。

10. 如权利要求 9 所述的装置, 其特征在于, 第二液体培养基具有与第一液体培养基不同的组成。

多孔无机膜载体及其使用方法

本发明涉及适于动植物细胞生长的多孔无机膜载体的使用方法。某些细胞如成纤维细胞和转化细胞比较容易进行培养。这些细胞可在各种固体表面（如塑料或玻璃）上附着并增殖，甚至能够悬浮生长。但其它一些哺乳动物细胞如来自上皮组织的分化细胞却必须固着，因而难于生长。（分化细胞是具有特定功能特点的细胞。多细胞生物体内的大多数细胞都是分化细胞，例如哺乳动物的血细胞、神经细胞和肌肉细胞）。而且，如果在不透性的表面上培养上皮细胞，则不可能发育出分化特性。

然而，现已发现，如果在渗透性载体上培养上皮细胞，则该细胞可以产生分化。这可以归因于渗透性载体使得细胞可通过上下两个表面来获得养分这样一个事实。

有人描述了在组织培养中用膜作为角质细胞(Keratinocyte)的载体(F.L.Vaughan, R.H.Gray and I.A.Bernstein, *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 22, 141-149, 1986)。作者观察了角质细胞在各种合成有机膜上接种并培养后其原始培养的附着、增殖和分化情况。在两种膜上没有达到满意的附着。为组织培养操作而特别制备的膜的支持附着和增殖的能力，与用作对照的塑料培养容器相同或更强。所试验的三种透明膜中，没有一种能够象用作对照的塑料培养容器一样支持附着和增殖。如果用粘连蛋白预涂这些膜，则所获结果略好些。

一方面，本发明提供一种支持细胞生长或保持细胞于其上的多孔

无机膜载体。另一方面，本发明提供一种培养或保持细胞的方法，它是将细胞培养物涂到一种多孔无机膜载体上，然后将该细胞保持在一定条件下，使其在此载体上生长。

使用无机膜载体的优越之处在于，它们一般是惰性的并且对细胞无毒，而且通常可进行加热或用其它方法灭菌而不会损坏之。膜载体可由多种材料制成，包括金属氧化物如氧化锆，而氧化铝则更好。在一些文献中介绍了这种多孔无机膜。例如，氧化铝及其它金属氧化物膜可以用溶胶-凝胶技术来制备 (A.F.M. Leenaars et al., *Journal of Material Science*, 19(1984), 1077-1088); 或利用带铸 (tape-casting) 技术来制备 (R.E. Mistler et al., *Ceramics Processing Before Firing*, 411-448, ed. G.Y. Onoda et al., Wiley, N. Y., 1978)。多孔膜可以采用 EPA 224443 和 224444 所述的方法来制备。最好采用阳极氧化铝膜。

当铝基质在某些电解液如稀硫酸中阳极化时，在其表面形成多孔阳极氧化物膜，大部分是由无定形氧化铝构成的。这些孔从膜的外表面延伸到接近金属/氧化物的界面。与金属/氧化物界面相邻的是一层薄的阳极氧化物粘附层 (氧化物保护层)。阳极氧化物膜可从金属基质上分离下来，而在该基质上可采用几种技术成膜，所有这些技术都能产生具有通常为圆柱状孔的对称膜，这些孔从一个表面延伸到另一个表面，并且在其整个长度上通常具有均匀的直径。

EPA 178831 描述了制备多孔膜的方法，即，利用缓慢降压技术将常规的阳极氧化铝与其金属基质分开，这一技术旨在使保护层变薄，最终使处在金属/氧化物界面的所有剩余的保护层溶解。所得到

的不对称阳极氧化铝膜具有从膜的一个表面延伸至另一表面的孔，包括一些较大的从某一表面伸入的孔，与一些较小的从另一表面伸入的孔互连。

剥离的多孔阳极氧化铝膜，不论是对称型的还是不对称型的，都由于具有下列性质而特别适于作组织培养载体：

- 它们是高度多孔的；

- 它们通常是透明的，因此允许在原位对细胞进行显微镜观察；

- 它们是光滑的；

- 它们是刚性的，因此便于机械转移完整的细胞单层；

- 它们是无毒的；

- 它们不易受有机化学药剂的作用，这对处理细胞以便进行观察可能是很重要的；

- 它们是可灭菌的，例如通过高压灭菌或利用紫外或 γ 射线灭菌。

某些市售的组织培养用有机膜的孔度较低，在某些情况下，这会限制细胞的生长。阳极氧化铝膜则不会产生这一问题，这种膜可被设计成高度多孔的。这类膜的孔径的大小易于通过控制阳极化条件来控制。一般来说，这些孔应小至足以支持生长着的细胞，使细胞能定位于膜的表面上。在某些情况下，这些孔可能需大至足以允许细胞养分，包括分子量高至150KDa的蛋白质的透过。一般情况下，阳极化条件和电解液似乎并不重要。我们曾利用在磷酸和混合电解液中阳极化而制成的、孔径为0.2微米和0.02微米的膜同样成功地进行了细胞培养。膜的厚度也不重要，但较厚的膜具有刚性较好的优点，而较薄的膜可以具有较好的透光性。膜可以是平的，也可以是异型的，例如欧洲专利87303336所述者。

虽然支持膜上所培养的细胞的性质并不重要，但本发明特别涉及哺乳动物细胞的培养。本发明很可能特别适用于培养必须固着的细胞，即那些在悬浮状态就不能生长或者将丧失其分化特性的细胞。本发明适用于转化的细胞，特别是分化细胞。下面的实验部分将举出一些细胞系的例子。本发明特别适用于培养或保持在合成培养基上不易生长的细胞类型，例如大鼠肝细胞。曾在多孔阳极氧化铝膜载体上保持了人的胰岛。

细胞生长的条件并不重要，并且可以应用常规条件。下面的实例2报道了这样一个观察结果：发现一种特定细胞系在阳极氧化铝膜上可在仅含2.5%胎牛血清的培养基中生长，但这些细胞在这一血清浓度下却不能在常规塑料载体上生长。这一独立的观察结果可能表明，使用本发明的多孔无机膜载体可以使细胞在较低的血清浓度下生长。

发现哺乳动物细胞容易粘附在本发明所用的多孔无机膜载体上。这是不可预见的。例如，已知哺乳动物细胞如果事先很充分地清洗过就只会在玻璃载体上粘附。预涂多孔载体使细胞的粘附增强属常规操作，例如用胶原、昆布氨酸或粘连蛋白预涂。但用这种方式进行预涂不仅费力，而且在以后为进行显微镜观察对细胞进行染色时也产生一些问题。例如，胶原涂层会干扰胶原染色步骤。实际上，某些有机组织培养载体甚至在未涂层时也会产生染色困难。

业已发现，本发明所用的多孔无机膜载体一般对细胞具有良好的粘附性而无需预涂。但如果需要，也可以对载体进行预涂，例如用上述材料进行预涂。该载体也可以支持粘附的细胞单层，而细胞单层本身可作为不同来源的另一些细胞的载体。另一方面，也可以除去细胞单层而在无机载体上只留下基底膜，在该膜上可以涂布不同来源的细

胞。

使用透明膜载体的一个极好的优点在于，生长着的细胞可以在原位用相差显微镜或普通透射光显微镜进行观察。为保持无菌，可将细胞浸入液体培养基，而从下部透过膜载体来观察细胞，照明则是从上部提供的。对于光学显微镜或扫描电子显微镜 (SEM) 观察，可以用标准技术做细胞制片。利用这些载体在扫描电镜下观察，可获得极好的图象。为光学显微镜观察而固定和染色细胞的方案如下。

为实施本发明，可将一片膜载体置于标准的组织培养容器中，将悬浮在生长培养基中的细胞涂布到上表面。盖紧培养容器，在合适的条件下进行培养。如果这一设计不能使培养基透过多孔膜载体而充分进入生长的细胞，那么这个问题可以这样解决，方法是把膜支起来，使其略高于组织培养容器的底。最好的方法是，将膜圆片连在一个短塑料管的一端以形成一个顶部开口的圆筒，其直径比其长度大得多。绕载体膜圆片的周边给该圆筒装置一些底座，以下称此圆筒为培养插筒。它包括一个其直径一般大于其长度的短管，和一个多孔无机膜如多孔阳极氧化铝膜，该膜圆片密封在短管的一端，活细胞则保持在管内的膜上（例如粘附在膜上）。

在靠近多孔膜载体的上表面和下表面供给不同的培养基可能是有利的。例如，靠近下表面的培养基可以含有细胞生长所需的养分，该养分可穿过膜载体的孔而供给生长的细胞。细胞可能会产生大分子量的代谢物，它们也许太大而不易通过载体膜的窄孔而扩散。靠近载体膜上表面的液体培养基可以含有这些代谢物，因此具有与靠近下表面的培养基不同的组成。这一特点可能有利于测定生长的细胞的成活率或性质。

参见附图，其中：

图1是一组示意图，表示所提出的用多孔无机膜作必须固着的细胞的载体。

图2是放在组织培养平板的一个孔中的培养插筒的剖面侧视图。

图1a表示一个膜载体10支持上皮细胞的一个单层12，包括基底膜14和腔膜16。

图1b表示这一完整装置作为不同来源的细胞（如脂肪细胞）的另一单层18的载体。

图1c表示了一种设计，其中上皮细胞已被杀死而留下了基底膜20，其上已粘附了脂肪细胞18。

参见图2，培养插筒包括：一段通常为圆筒形的塑料管30，其直径大于其长度；一个多孔无机膜圆片32，该膜靠近塑料管的底端并且绕其周边被密封在该塑料管内侧，该管则有一个下凹用来放置膜；底座33，它使该膜升离底部。培养平板包括底34，壁36，它们限定了各个小孔（这里只画出一个）；还包括一个平板盖38。该小孔中已装有一部分培养基40。培养插筒已放在该小孔中，使培养基40只接触膜的下表面。另一种组成相同或不同的培养基42已装入培养插筒。细胞单层44粘附在膜的上表面，并通过膜孔与培养基40接触。

下列实例说明本发明。

实例1

采用三种细胞类型。

Madin Darby 犬肾细胞 (MDCK)

小鼠胚成纤维细胞 (3T3)

牛角膜内皮细胞 (BCE) (初生细胞)

BCE细胞培养基配方为:

William E 基本培养基 (无谷氨酰胺): 100 ml

胰岛素: $10\mu\text{g}/\text{ml}$

转铁蛋白: $10\mu\text{g}/\text{ml}$

青霉素/链霉素

两性霉素B

氢化可的松: $10\text{ng}/100\text{ml}$

谷氨酰胺

上皮生长因子: $10\text{ng}/\text{ml}$

微量元素

胎牛血清: 10%。

MDCK 和 3T3 细胞培养基配方与上述相同, 但去掉转铁蛋白、氢化可的松和上皮生长因子。

所用的阳极氧化物膜为磷酸和草酸混合型, 有 $0.2\mu\text{m}$ 和 $0.02\mu\text{m}$ 两种孔径 (下面的表中分别记作 $0.2\mu\text{m}$ 和 $0.02\mu\text{m}$)。

用常规方法将细胞接种到 11mm 的膜圆片上, 把这些膜圆片放在 24 孔的组织培养盘中, 接种密度为 10^4 个细胞/ ml ($1\text{ml}/\text{孔}$)。作为对照, 以同样的密度将细胞接种到不加膜的孔中。

测定在塑料或膜上培养的细胞的成活率, 方法是用胰酶消化、台盼蓝染色并计数染色的和未染色的细胞。结果示于表 1。

这表明, 所有这三种细胞类型在用酶学方法从所研究的基质上释出后, 其成活率没有明显不同。这表示在进行传代培养时, 该膜可以如塑料基质一样进行处理。

表 1

三种细胞类型在不同基质上的

%成活率 \pm 平均标准误差($n=3$)

细胞类型	塑 料	0.2ME	0.02ME
MDCK	83% \pm 11.9	72% \pm 14.9	70% \pm 6.7
3T3	70% \pm 3.8	66% \pm 4.8	81% \pm 15.4
BOE	95% \pm 5.2	81% \pm 7.6	76% \pm 2.3

以 10^4 个细胞/孔的密度接种后测定细胞在 Anopore 或塑料上附着的比率和效率。

表 2 表明, 所有三种细胞类型在塑料和 $0.02\mu\text{m}$ 膜上的接种效果都同样良好。但在 $0.2\mu\text{m}$ 膜上培养的 MDCK 细胞和 BOE 细胞却都表现出低得多的接种效率。这表明, $0.02\mu\text{mME}$ 膜附着细胞的能力比塑料要强, 而 $0.2\mu\text{mME}$ 膜则差一些。

表 2

%接种效率 \pm 平均标准误差($n=3$)

4 小时

细胞类型	塑 料	0.2ME	0.02ME
MDCK	33% \pm 12.1	21% \pm 10.4	26% \pm 6.6
3T3	14% \pm 4.8	11% \pm 5.4	19% \pm 3.9
BOE	29% \pm 5.5	16% \pm 7.1	31% \pm 8.6

8 小时

细胞类型	塑 料	0.2ME	0.02ME
MDCK	39% \pm 3.6	21% \pm 11.1	26% \pm 6.4
3T3	24% \pm 6.9	19% \pm 2.3	25% \pm 1.8
BCE	41% \pm 7.8	17% \pm 3.6	35% \pm 5

在塑料及 0.2 μ m 和 0.02 μ m ME 膜上培养细胞 7-10 天, 然后以高接种密度在其各自的基质上进行一代培养。接着, 计数在 4 小时和 8 小时后于上清液中回收的细胞, 并计算出接种效率, 用下式表示:

$$\frac{\text{接种细胞总数减去上清液中细胞数}}{\text{接种细胞总数}} \times 100$$

也测定了涂布效率。取 1ml 细胞悬浮液 (2-50 个细胞/ml) 放在 24 孔培养盘中的空孔和包含有膜圆片的孔中。由 16 个细胞或更多个细胞生长 5 天后的集落数计算涂布效率。

$$\frac{\text{形成集落数}}{\text{接种细胞数}} \times 100 = \text{涂布效率}$$

表 3 表明, 在塑料及 0.2 μ m 和 0.02 μ m 膜上培养的细胞的涂布效率差不多。实际上, 在 0.02 μ m 膜上培养的细胞的涂布率明显高于塑料上的涂布率。这表明阳极氧化物膜可如塑料同样有效地促进细胞的生长。

观察表明, 通常可在 10-14 天内阳极氧化物膜上达到汇合, 这比之塑料也是非常良好的。

表 3

三种细胞类型在不同基质上的

%涂布效率±平均标准误差(n=3)

细胞类型	塑 料	0.2ME	0.02ME
MDCK	23%±4.3	19%±6.2	27%±7.83
3T3	11%±2.1	9%±1.9	19%±5
BCE	17%±2.2	17%±3.7	28%±1.5

透射电子显微镜(TEM)观察证明, BCE 细胞明显极化并具有紧密连接。

实施 2

培养下列细胞系:

Madin Darby 犬肾细胞(MDCK)—必须固着。

牛角膜内皮细胞(BCE)—必须固着。

小鼠浆细胞瘤(X63-AG8-6SS)—不必固着。

小鼠杂交瘤PF—不必固着。

小鼠杂交瘤303—不必固着。

通过高压灭菌、在无水乙醇中浸泡或紫外辐射对多孔阳极氧化铝膜进行灭菌。此外也可利用 γ 辐射对培养插筒(含有底部封有膜圆片的一段短塑料管的上端开口容器)进行预灭菌。

用细胞悬浮液接种前, 将无菌平膜片或培养插筒放入24孔或6孔组织培养平板中。

为了对细胞进行传代培养, 在含EDTA的无菌胰酶($52\mu\text{g}/\text{ml}$)缓冲液中剥离MDCK或BCE细胞的单层。对小鼠浆细胞瘤和杂交瘤细胞系, 通过轻轻摇动培养容器或抽吸即可简单地移出。在37℃下于5% CO_2

95%空气中培养细胞。用于所有细胞系的培养基中含有：

Dulbecco's 基本必需培养基 (DMEM)

10% 胎牛血清 (FCS)

4 mg/l 硫酸庆大霉素。

发现所有细胞类型在平膜片和培养插筒上都生长良好。用普通光学显微镜(既观察未染色的,也观察染色后的)和扫描电镜观察细胞单层。建立了光学显微镜染色细胞(见下)及扫描电镜观察制片的方案。

发现 BCE 细胞可在含 2.5% 胎牛血清的插筒装置中生长。在这一血清浓度下,这些细胞不能在塑料载体上生长。

实例 2

培养下列细胞系：

牛角膜内皮细胞 (BCE)

幼仓鼠肾细胞 (BHK)

初生大鼠脑细胞。

BCE 和 BHK 所用的生长培养基为 Glasgow 修改的 Eagles 培养基。大鼠脑细胞的生长培养基为 DMEM。所有情况下都使用 10% 胎牛血清。用培养插筒支持细胞,培养物在 37℃ 下于 5% CO₂/95% 空气中进行培养。

在插筒装置上所有细胞都生长良好。已对用这种方法培养的 BHK 和大鼠初生脑细胞建立了免疫荧光染色方案。

对于在多孔透明无机载体培养基上固定和染色用于光学显微镜观察的细胞的方案,应注意如下问题。

可用的固定剂包括仲甲醛、甲醛、甲醇和戊二醛,最好是 2% 仲

甲醛在PBSA中的溶液。可用的染料包括Weigert's/Van Geeson、吉姆萨、吉姆萨/亮绿、利什曼、苏木精/曙红，最好是Weigert's/Van Geeson(染核为紫色，染胶原为桃红色)。为了光学显微镜观察而对细胞培养物进行永久染色的方案如下。

材料

1. 2% 仲甲醛在PBS中的溶液，pH 7.3

2. 如下制备Weigert's 苏木精铁

溶液A: 1g 苏木精

100ml 无水乙醇

溶液B: 4 ml 氯化铁水溶液(30%)

1 ml 浓盐酸

95ml 蒸馏水

用玻璃纤维纸过滤这两种溶液(2次)。混合等体积的溶液A和溶液B，立即使用。

3. 如下制备Van Geeson's染料:

100ml 饱和苦味酸

5-10ml 酸性品红(1%)

如上所述进行过滤。

4. 乙醇(30%、50%、70%、90%和100%)

5. "Histo-clear"(购自National Diagnostics, New Jersey USA.)

6. DePex胶粘剂(BDH Chemicals Ltd.)

方法

(在完整的组织培养插筒上实施完全的染色方案)。

1. 在37℃下, 于2%仲甲醛在PBS中的溶液 (pH7.3) 中固定湿润的膜1-24小时。
2. 用蒸馏水充分洗涤。
3. 在新混合的Weigert's 苏木精铁中染色5-10分钟。
4. 用蒸馏水充分洗涤。
5. 在Van Geeson's染剂中染色至多10分钟。
6. 用蒸馏水充分洗涤。
7. 在浓度递增的乙醇(30%、50%、70%、90%和100%)中脱水, 每一浓度脱水2分钟。
8. 空气干燥。
9. 浸在"Histo-Clear"中。
10. 用DePeX胶粘剂将膜固定在载玻片和盖玻片之间。

实例4

在含有10%胎牛血清和4mg/l硫酸庆大霉素的Dulbecco's 基本必需培养基 (DMEM)上培养MDCK 细胞。

如上所述在装置(插筒)中把所用的阳极氧化物膜(孔径为0.2 μm 和0.02 μm , 直径为25 mm)支起来。

以 2×10^4 个细胞/ cm^2 的浓度, 将MDCK 细胞接种到置于6孔组织培养盘的各孔中的25 mm插筒中, 或直接接种到这些孔中。孔中接种总量大致为插筒所需接种量的二倍。两种情况下所用的培养基的总体积都为3 ml/孔(如果用插筒, 则培养基的水平线在内外槽之间持平)。

建立了塑料上的细胞和氧化物膜上的细胞的生长曲线。用下述分光光度法估算细胞数量。从孔或插筒中吸出培养基并保留(以计数所

有悬浮的松散细胞)。将5ml含0.04% EDTA的0.05% W/V 胰酶溶液加至细胞单层中,作用30秒后倾出溶液。然后将细胞单层在37°C下放置5-7分钟,之后加入10ml溶液A + 10%胎牛血清。用Ependorf吸液管小心抽吸使细胞重新悬浮。利用红霉素B染料排除法和—个改进的Neubauer槽测定细胞的浓度和成活率。

制作—条标准曲线用来将光密度(OD)换算成细胞数,方法是,用溶液A + 10%胎牛血清将细胞悬浮液的浓度调至所需的最高标准(5×10^5 个细胞/ml),制备—系列双份稀释液直至浓度降至 10^4 个细胞/ml。然后在780nm处对照溶液A + 10%胎牛血清的空白液读出细胞悬浮液的光密度。

利用光密度法分析三种表面($0.2\mu\text{m}$ 膜、 $0.02\mu\text{m}$ 膜及塑料)上的5个重复的培养物,并将此测定结果换算为细胞数。结果列于表4。

结果表明,在阳极氧化物膜上的生长速度比在塑料上快,并能获得较高的细胞收率。 $0.02\mu\text{m}$ 膜看起来比 $0.2\mu\text{m}$ 膜要好。

表 4

活细胞数/cm² ($\times 10^4$)

天	塑 料	$0.2\mu\text{m}$ 膜	$0.02\mu\text{m}$ 膜
1	2	2	2
4	8.5	6.5	9.5
7	17.5	12	15
11	16	19	26.5

实例 5

用常规胶原酶灌注法或毛地黄皂苷/胶原酶灌注法分离大鼠实质

肝细胞。

在阳极氧化物膜 (装有 $0.2\mu\text{m}$ 膜的 25mm 插筒) 上培养肝细胞单层, 并与常规组织培养皿 (Lux) 上的单层作比较。

接种 2 小时后, 用酶法测定涂布效率。从平板或插筒中吸出培养基, 取一份样品进行离心沉降 ($100g$, 2 分钟)。另取一份样品进行超声处理。测定乳酸脱氢酶活性, 并用整个悬浮液与上清液的活性差作为未附着细胞的指标。

2 小时后, 膜培养和培养皿培养中未附着细胞的百分比相似, 说明它们的涂布效率相似。

肝细胞附着 (4 小时) 后, 培养单层 20-48 小时, 通过检测特定底物的代谢评价肝细胞的代谢性能。测定底物代谢率和产物生成率。阳极氧化物膜和培养皿上的细胞单层中, 脂肪酸代谢成酮体的速率相似 (表 5), 但在 Anopore 膜上的单层中, 线粒体丙酮酸的代谢率及丙酮酸转化成乳酸的转化率较高 (表 6)。

这些结果表明, 阳极氧化物膜能够作为肝细胞培养的良好载体, 与常规塑料相比, 在这种载体上某些代谢活动有所增强。

表 5

在培养皿和阳极氧化物膜上的肝细胞单层中由软脂酸或辛酸生成酮体的量

培养皿	膜
(nmole / 培养 / 小时)	

底物:

(1) 0.75mM 软脂酸 + 1mM 丙酮酸

实验 1 (全部细胞)

(3)	141 ± 3	(3)	167 ± 24
-------	-------------	-------	--------------

实验2 (门脉周围的细胞)	(4)	158 \pm 10	(4)	158 \pm 13
实验3 (静脉周围的细胞)	(4)	129 \pm 5	(4)	115 \pm 10

(2) 1 mM 辛酸

实验1 (全部细胞)	(3)	108 \pm 4	(3)	109 \pm 15
实验2 (全部细胞)	(5)	174 \pm 12	(5)	192 \pm 21

将由整个肝脏或由门脉或静脉周围区域分离的肝细胞单层加地塞米松和胰岛素培养20小时。加0.75 mM 软脂酸、1 mM 丙酮酸和0.5 mM L-肉碱，或加1 mM 辛酸培养2小时，在此期间测定酮体(乙酰乙酸+3-羟基丁酸)的生成率。所得数值为括号中所示数目的培养皿或膜上所获数值的平均值 \pm 标准差。

表 6

培养皿和阳极氧化物膜上的肝细胞单层中线粒体丙酮酸代谢及丙酮酸转化为乳酸。

培养皿 膜
(nmol 丙酮酸 / 培养 / 小时)

实验1 (静脉周围的细胞)				
线粒体丙酮酸代谢	(4)	106 \pm 8	(4)	232 \pm 36
乳酸生成		250 \pm 8		306 \pm 18
实验2 (门脉周围的细胞)				
线粒体丙酮酸代谢	(4)	230 \pm 32	(4)	386 \pm 12
乳酸生成		144 \pm 30		150 \pm 10
实验3 (全部细胞)				
线粒体丙酮酸代谢	(3)	154 \pm 8	(3)	194 \pm 15
乳酸生成		152 \pm 23		250 \pm 17

实验 3+ 胰高血糖素

线粒体丙酮酸代谢

(3) 178 ± 6 (3) 234 ± 10

乳酸生成

193 ± 7 302 ± 8

在无血清培养基中培养肝细胞单层 20 小时(实验 1 和 2)或 48 小时,培养基中加有 10 nM 地塞米松 + 10 nM 胰岛素,或另外加有胰高血糖素 (100 nM)。加 1 mM 丙酮酸和 0.75 mM 软脂酸培养 2 小时,在此期间测定丙酮酸代谢。由丙酮酸浓度的降低测定线粒体丙酮酸代谢率,这种降低不是由于丙酮酸转化成乳酸或丙氨酸而引起的。代谢率以每个培养物每小时代谢掉的丙酮酸的毫微摩尔数表示。所得数值为括号中所示数目的培养皿或膜上所获数值的平均值 \pm 标准差。

实例 6

与塑料作比较,评价中国仓鼠卵 (CHO) 细胞在阳极氧化物膜上的生长情况。

方案:

从用常规方法培养的培养物中取 100 个 CHO 细胞 (利用血细胞计数器计数来估计),用来接种浸在实验室标准 MEM 培养基中的每一片膜,该培养基添加有胎牛血清。

培养细胞 4 天,每天观察生长情况。每隔 24 小时用胰酶处理样品膜和对照孔以使细胞松动,并利用血细胞计数器计数估计每片膜上 (或每个孔中) 的细胞数,以估计细胞的相对倍增时间。每天用光学显微镜观察所有培养物,并在生长期结束时,收集具有代表性的样品,用来接种另一组膜,以证实细胞维持健康状态并能够在试验条件下生长后重新增殖。

每次观察时,从在单一时间点接种的平行原种培养中取 5 个样品。

试验所用的膜为：

- a) 孔径为 $0.02\mu\text{m}$ 的阳极氧化物膜
- b) 孔径为 $0.2\mu\text{m}$ 的阳极氧化物膜
- c) 在常规实验室塑料表面上培养的对照培养物。

观察。

看来，CHO细胞可在阳极氧化物膜上粘附且生长良好，而且在传代培养时，以一般方法用胰酶处理即可松动，这与细胞取自常规组织培养膜时效果相同，未检查到异常细胞；菌落形成情况看来也没有变化。计算出所有细胞计数的平均值和标准差。统计分析揭示出，在不同表面上CHO细胞培养物的生长速率没有任何明显差别。

实例 7

在阳极氧化物膜上培养MDCK和BOE细胞，并进行光学显微镜和电子显微镜制片。

如前所述（实例1），在直径为25 mm的膜上培养MDCK和BOE细胞。

用相差显微镜即能观察到细胞。与塑料上培养的细胞相比，图象清晰度没有降低。除实例3中所列举的染剂外，下列染剂也已成功地用于阳极氧化物膜上的细胞：

Wiegerts/Van Gieson + 亮绿

Wiegerts/Van Gieson + 中性红

天青石蓝 + Mayers 苏木精

Heidenhains 苏木精 + 铁明矾

用上述染剂对膜本身进行背景染色用量最小，各种细胞组分的显示效果与在塑料或玻璃上染色一样良好。膜的透明度是极为重要的优

点。此外，还对膜上的BHK和CHO细胞进行了免疫荧光染色。所得图象与最小背景荧光的对比度很高。

可以利用标准操作方法将适当染色的膜固定在显微镜载玻片之上、盖玻片之下。这种制片不产生退色现象，而这类制片通常会在一段时间后发生染剂退色现象。

业已对在阳极氧化物膜上培养的细胞建立了基本的扫描电镜制片方法。

无机膜对扫描电镜制片法中所用的有机化学试剂具有耐受性，因此无机膜的适用范围极广。这种膜的刚性也使其比细胞培养用有机高分子膜更易于操作。已制造了一种特殊的工具用来从插筒装置中取出完整的膜圆片。此圆片的直径约为22mm，并与标准的不锈钢载样网相配而可用于制备多个样品（膜）进行电子显微镜观察。

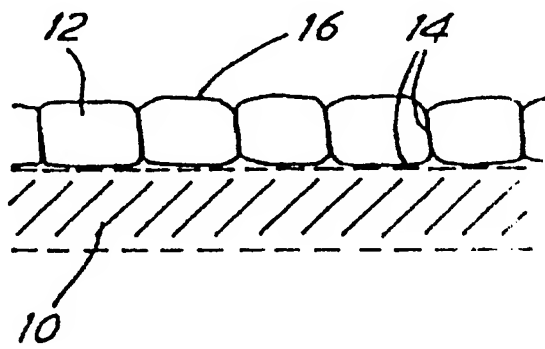


图 1a

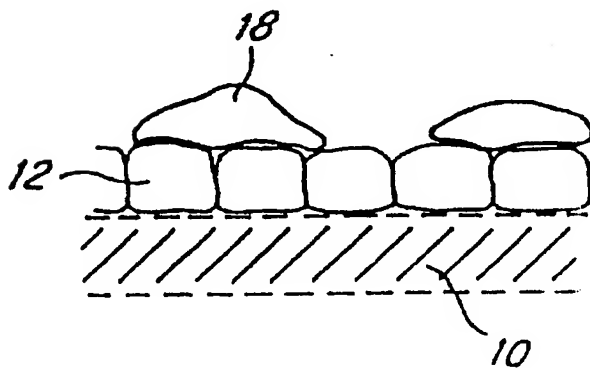


图 1b

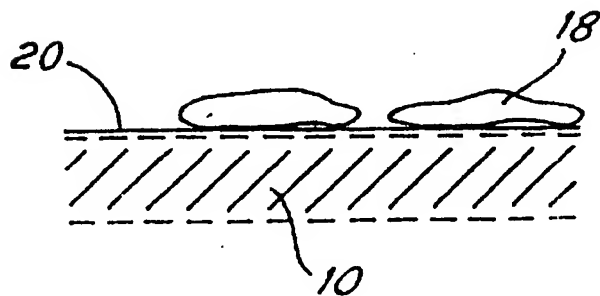


图 1c

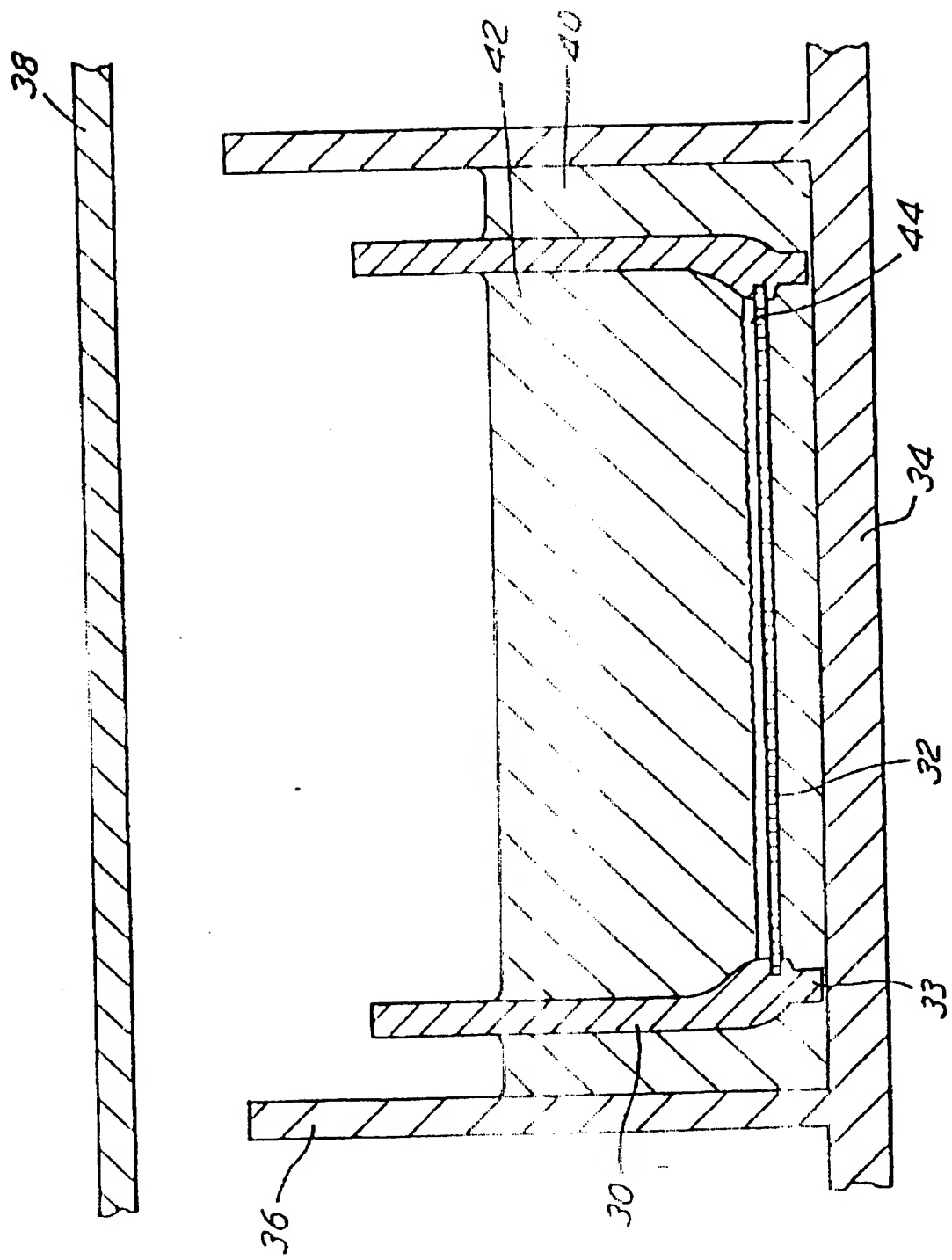


图 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.